

日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application: 1998年 3月11日

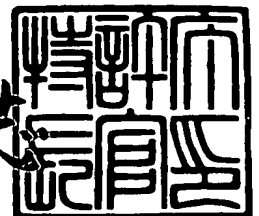
出願番号
Application Number: 平成10年特許願第059892号

出願人
Applicant(s): オリンパス光学工業株式会社

1999年 2月19日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

伴佐山 建志



出証番号 出証特平11-3007162

【書類名】 特許願

【整理番号】 A009800613

【提出日】 平成10年 3月11日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G02B 21/00
G01N 21/64

【発明の名称】 レーザ顕微鏡

【請求項の数】 3

【発明者】

【住所又は居所】 東京都渋谷区幡ヶ谷 2丁目4 3番2号 オリンパス光学
工業株式会社内

【氏名】 富岡 正治

【特許出願人】

【識別番号】 000000376

【氏名又は名称】 オリンパス光学工業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100058479

【弁理士】

【氏名又は名称】 鈴江 武彦

【選任した代理人】

【識別番号】 100084618

【弁理士】

【氏名又は名称】 村松 貞男

【選任した代理人】

【識別番号】 100068814

【弁理士】

【氏名又は名称】 坪井 淳

【選任した代理人】

【識別番号】 100100952

【弁理士】

【氏名又は名称】 風間 鉄也

【選任した代理人】

【識別番号】 100097559

【弁理士】

【氏名又は名称】 水野 浩司

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 011567

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9602409

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 レーザ顕微鏡

【特許請求の範囲】

【請求項1】 パルスレーザを標本面でレーザパルス幅を最小にするための光学系に通し、この光学系を通過したパルスレーザを複数の対物レンズのうち所望の対物レンズにより前記標本に集光するレーザ顕微鏡において、

複数の前記対物レンズのそれぞれに対応し前記標本面での前記レーザパルス幅を一定にする複数の補正光学素子を具備したことを特徴とするレーザ顕微鏡。

【請求項2】 複数の前記補正光学素子は、複数の前記対物レンズの切り換えに連動して切り換わることを特徴とする請求項1記載のレーザ顕微鏡。

【請求項3】 複数の前記補正光学素子は、前記パルスレーザが平行光束として進行するところに配置されたことを特徴とする請求項1記載のレーザ顕微鏡。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、パルスレーザを標本に照射し、この標本上の集光位置で生じる多光子吸収による化学反応及び蛍光を検出する走査型のレーザ顕微鏡に関する。

【0002】

【従来の技術】

多光子励起法は、通常の1光子（単光子）で行われる励起を多光子で行う方法で、例えば2光子励起法では、400nm（単光子）の波長で行っていた蛍光励起を倍の波長800nmで行うものである。この波長800nmでは2光子を用いて蛍光励起が行われる。

【0003】

このような多光子励起法に用いられる光源としては、例えばサブピコ秒のパルスレーザが用いられる。これは多光子励起現象がその単位面積、単位時間当たりの光子密度の2乗にほぼ比例した確立で発生するため、このサブピコ秒のパルスレーザでは、複数の光子が存在する確立が高くなる。

【0004】

なお、蛍光顕微鏡に使用されている水銀ランプや連続発振のレーザでは、単位時間当たりの光子密度が低いため、多光子励起現象を引き起こすためには、莫大な光強度が必要とされる。さらに、光学系や標本へのダメージが大きくなる等の問題を解決しなければ実用には適さない。

【0005】

このような事から例えば特表平5-503149号公報に記載されているようにサブピコ秒のパルスレーザを出射するレーザ光源を用い、このレーザ光源から出射されたパルスレーザで対物レンズの像面を走査するための走査光学ユニットと一般的な顕微鏡とを組み合わせた2光子励起走査型レーザ顕微鏡がある。

【0006】

一方、多光子励起に用いられるサブピコ秒のレーザ光源から出射するパルスレーザは、完全に単色でなく、そのパルス幅と相関を持つある波長幅を有している。

【0007】

一般的に光が光学系を通過する場合、波長が短いほど媒質中での速度は遅く、波長が長いほど媒質中での速度は速くなる。これにより上記の如くレーザに波長幅があると、レーザが光学系を通過する際に波長によって時間的な差が発生し、結果的に光学系に入射する前のパルス幅に比べ、その幅が広がってしまう。

【0008】

このように多光子励起現象が生じる確率は、光子密度に依存しているため、標本面でのパルス幅の広がり、多光子励起現象が発生する確率を低下させるといった問題を引き起こす。

【0009】

このような問題を解決する方法としては、例えばパルス状のレーザをプリズムペア若しくはグレーティングペアを用いて短い波長の光を先に出す、言い換えれば長い波長の光を遅らせるという手法、所謂プレチャープコンペンセーションが一般的である。

【0010】

この手法に関しては、例えば文献『Femtosecond pulse width control in microscopy by two-photon absorption autocorrelation / by G.J.Brakenhoff, M.Muller & J.Squier / J.of Microscopy, Vol.179, Pt.3, September 1995,pp .253-260』に記載されている。この文献について詳しい説明は省略するが、プリズムペア若しくはグレーディングペアを移動させることにより標本面でのレーザーパルス幅を任意に可変できることが記載されている。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、多光子励起走査型レーザー顕微鏡では、レーザー光源から出射されたパルスレーザーが対物レンズを透過する際、波長により媒質内を通過する速度の違いが生じるため標本面（対物レンズ焦点位置）では、レーザー出射端に比べ、レーザーパルス幅が広がってしまう。そこで、プレチャープコンペンセータを使用して標本面でパルス幅が最小となるように調整を行っている。

【0012】

ところが、対物レンズは、倍率、種類が異なれば、当然に光学系も異なるので、レーザー光源から出射されたパルスレーザーのパルス幅の広がり具合は対物レンズによって一定でない。

【0013】

ところで、走査型レーザー顕微鏡では、顕微鏡観察と同様に、先ず広範囲の観察が可能な低倍率の対物レンズを使用して標本における観察対象を検索し、この後に細部を観察するための高倍率の対物レンズに切り換えて使用するのが一般的である。

【0014】

但し、対物レンズを切り換えることによって標本面でのパルス幅が変化するので、最適な条件で多光子励起現象を引き起こすためには、プレチャープコンペンセータの調整が必須となる。

【0015】

しかしながら、このプレチャープコンペンセータの調整では、このプレチャープコンペンセータの調整に費やす時間に比例して標本に発生している蛍光は、褪

色してしまうという問題がある。

【0016】

又、蛍光の褪色を防ぐ対策としては、プレチャープコンペンセータの調整時に観察視野内から標本を移動するといった方法があるが、この方法では、プレチャープコンペンセータの調整後に再び観察視野内から標本を移動しなければならないため、標本を移動前と全く同じ位置に標本を戻すことは不可能であり、観察及び測定には適する方法でない。

そこで本発明は、対物レンズの切り換えによって標本面でのレーザーパルス幅が変化しないレーザー顕微鏡を提供することを目的とする。

【0017】

【課題を解決するための手段】

請求項1によれば、パルスレーザーを標本面でレーザーパルス幅を最小にするための光学系に通し、この光学系を通過したパルスレーザーを複数の対物レンズのうち所望の対物レンズにより標本に集光するレーザー顕微鏡において、

複数の対物レンズのそれぞれに対応し標本面でのレーザーパルス幅を一定にする複数の補正光学素子を具備したレーザー顕微鏡である。

【0018】

請求項2によれば、請求項1記載のレーザー顕微鏡において、複数の補正光学素子は、複数の対物レンズの切り替えに連動して切り替わる。

請求項3によれば、請求項1記載のレーザー顕微鏡において、複数の補正光学素子は、パルスレーザーが平行光束として進行するところに配置されている。

【0019】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の一実施の形態について図面を参照して説明する。

図1は走査型レーザー顕微鏡の構成図である。

床からの振動を排除する除振台1上には、2つの架台2、3が設けられ、このうち架台2上には、レーザー光源4、ビームコリメータ5及びプレチャープコンペンセータ6が設けられている。

【0020】

レーザ光源 4 は、近赤外極短パルスレーザ（以下、パルスレーザと省略する）Q を発振するもので、このレーザ光路上に上記ビームコリメータ 5 及び上記プレチャープコンペンセータ 6 が配置されている。

【0021】

このうちビームコリメータ 5 は、レーザ光源 4 から出射されたパルスレーザ Q を平行光束にコリメートするものである。

又、プレチャープコンペンセータ 6 は、例えばプリズム等の光学素子 6 a ~ 6 d から構成され、コリメートされたパルスレーザ Q を入射し、そのパルスレーザ Q の短波長ほど先に自身のプレチャープコンペンセータ 6 から出射させる作用を持っている。

【0022】

又、架台 3 上には、走査光学ユニット 7 が設けられている。この走査光学ユニット 7 は、プレチャープコンペンセータ 6 から出射されたパルスレーザ Q を標本 S の断面 S' 上で走査させるもので、この走査光学ユニット 7 の出射側には、リレーレンズ 8、光路折り曲げ装置 9 を介して顕微鏡 10 が設けられている。なお、これらリレーレンズ 8、光路折り曲げ装置 9 及び顕微鏡 10 は、光軸が一致するように配置されている。

【0023】

ここで、顕微鏡 10 から説明すると、この顕微鏡 10 も除振台 1 上に固定されている。この顕微鏡 10 は、コ字形状の筐体 11 の上部に結像レンズ 12 が設けられ、かつこの結像レンズ 12 の下方側にレボルバ 13 が回転自在に設けられている。

【0024】

このレボルバ 13 には、それぞれ倍率の異なる複数の対物レンズ、例えば 3 つの対物レンズ 14 a, 14 b, 14 c が取り付けられ、これら対物レンズ 14 a, 14 b, 14 c のうちいずれか 1 つの対物レンズ 14 a, 14 b 又は 14 c が光軸上に位置決めされるものとなっている。

【0025】

又、顕微鏡 10 の筐体 11 には、ステージ 15 が設けられ、このステージ 15

上に上記標本 S が載置されている。

上記走査光学ユニット 7 には、プレチャープコンペンセータ 6 から出射されたパルスレーザ Q と標本 S で生じた蛍光とを分離するダイクロイックミラー 16 が設けられている。

【0026】

このダイクロイックミラー 16 を透過するパルスレーザ Q の光路上には、互いに直交方向に走査する一対のガルバノミラー 17, 18 が配置され、その走査したパルスレーザ Q の出射方向にリレーレンズ 8 が存在する。

【0027】

又、ダイクロイックミラー 16 から分離される蛍光の光路上には、集光レンズ 19、ピンホール 20 を介して微弱な光を検出するためのフォトマルチプライヤ 21 が配置されている。

【0028】

集光レンズ 19 は標本 S からの蛍光をピンホール 20 に集光させるものであり、ピンホール 20 は標本 S と共役な位置に配置されている。

なお、多光子走査型顕微鏡においては、対物レンズ 14 a, 14 b, 14 c の集光位置、つまり標本 S の断面 S' でのみ多光子励起現象が生じるので、ピンホール 20 は走査光学ユニット 7 に必ずしも必要でない。

【0029】

この走査光学ユニット 7 内には、補正板切換え装置 22 が内蔵されている。この補正板切換え装置 22 は、平行光束にコリメートされたパルスレーザ Q の光路上に配置されており、ターレット機構により複数の補正光学素子、例えば各対物レンズ 14 a, 14 b, 14 c に対応する各補正板 23 a, 23 b, 23 c をパルスレーザ Q の光路上に挿脱可能な機能を有している。

【0030】

又、この補正板切換え装置 22 は、レボルバ 13 の回転に対して電氣的又は機械的に連動するようにして、位置決めされた各対物レンズ 14 a, 14 b, 14 c に対応した各補正板 23 a, 23 b, 23 c をパルスレーザ Q の光路上に挿入する機構にしてもよい。

【0031】

これら補正板 23 a, 23 b, 23 c は、各対物レンズ 14 a, 14 b, 14 c に対応してそれぞれ標本 S 面でのパルスレーザの幅を一定にするもので、各対物レンズ 14 a, 14 b, 14 c 及び励起波長に合わせて最適な板厚に設計された同一硝材で作製されている。

【0032】

次に上記の如く構成された走査型レーザ顕微鏡の作用について説明する。

レーザ光源 4 からパルスレーザ Q が出力されると、このパルスレーザ Q は、ビームコリメータ 5 により平行光束に変換され、次にプレチャープコンペンセータ 6 に入射して標本 S の断面 S' でパルスレーザ幅が最小になるように調整されて走査光学ユニット 7 に導入される。

【0033】

この走査光学ユニット 7 に導入されたパルスレーザ Q は、各対物レンズ 14 a, 14 b, 14 c に対応したいずれか 1 つの補正板 23 a, 23 b, 23 c、例えば対物レンズ 14 a に対応した補正板 23 a を透過し、この対物レンズ 14 a に対応して標本 S 面でのパルスレーザの幅が一定になるように整形されてダイクロイックミラー 16 に入射する。

【0034】

そして、ダイクロイックミラー 16 を透過したパルスレーザ Q は、一対のガルバノミラー 17, 18 で反射され、この後、リレーレンズ 8、光路折り曲げ装置 9 を通って顕微鏡 10 に入射する。

【0035】

この顕微鏡 10 に入射したパルスレーザ Q は、結像レンズ 12 によって例えば対物レンズ 14 a の瞳径を満足するような光束径に変換されて対物レンズ 14 a に導入される。

【0036】

このように対物レンズ 14 a に導入されたパルスレーザ Q は、その対物レンズ 14 a によりステージ 15 上に載置された標本 S の断面 S' に集光される。

このとき標本 S は、その断面 S' に 2 光子励起現象が生じて部分的に励起され

、この断面 S' からは標本 S を染色した色素に応じた蛍光が発せられる。

【0037】

この蛍光は、再び対物レンズ 14 a に取り込まれ、結像レンズ 12、光路折り曲げ装置 9、リレーレンズ 8、一对のガルバノミラー 18、17 を通してダイクロイックミラー 16 に入射し、ここで分離される。

【0038】

このダイクロイックミラー 16 で分離された蛍光は、集光レンズ 19 によってピンホール 20 に集光され、このピンホール 20 を通過した蛍光のみがフォトマルチプライヤ 21 に入射する。このフォトマルチプライヤ 21 は、蛍光を受光してその光量に応じた電気信号を出力する。

【0039】

この状態に、走査光学ユニット 7 の一对のガルバノミラー 17、18 を XY 方向に走査すると、パルスレーザ Q は標本 S の断面 S' 上に XY 方向に走査される。

【0040】

このようにパルスレーザ Q を標本 S の断面 S' 上に走査したときのフォトマルチプライヤ 21 の出力信号をガルバノミラー 17、18 の走査に同期させれば、標本 S の断面 S' の 2 次元画像を構築できる。

【0041】

このようにして標本 S の 2 次元画像を得る際、その用途に応じてレボルバ 13 を回転し、対物レンズを 14 a、14 b 又は 14 c に切り換える場合、レボルバ 13 の回転若しくはスイングさせるとほぼ同時に補正板切換え装置 22 を回転させると、使用する対物レンズ 14 a、14 b 又は 14 c に対応した補正板 23 a、23 b、23 c が平行光束にコリメートされたパルスレーザ Q の光路上に挿入される。

【0042】

このように上記一実施の形態においては、複数の対物レンズ 14 a、14 b、14 c に対応してそれぞれ標本 S の面でのレーザパルス幅を一定にする複数の補正板 23 a、23 b、23 c を備えたので、レボルバ 13 を回転若しくはスイン

グさせて対物レンズ 14 a, 14 b, 14 c を切り換える場合、レボルバ 13 を回転若しくはスイングとほぼ同時に補正板切変え装置 22 を回転させて各対物レンズ 14 a, 14 b, 14 c に対応した各補正板 23 a, 23 b, 23 c を光路上に挿入するので、例えば、対物レンズ 14 a と補正板 23 a とを用いて初期段階（装置セットアップ時）に標本 S の断面 S' でのレーザパルス幅を最小に調整すれば、その後、対物レンズ 14 a を他の対物レンズ 14 b 又は 14 c に切り換えた際、これら対物レンズ 14 b, 14 c に対応した各補正板 23 b, 23 c の作用によってプレチャープコンペンセータ 6 の調整がなくても、標本 S の断面 S' でのレーザパルス幅を最小でかつ常に一定にすることができる。

【0043】

そのため、瞬時に最適な状態で多光子励起の観察が可能となるとともに、蛍光の褪色を最小限に抑えることができ、作業効率が向上する。

又、補正板切換え装置 22 をレボルバ 1 の回転に対して電氣的又は機械的に連動して同時に各補正板 23 a, 23 b, 23 c を切り換えるようにしたので、操作が簡単となり、作業効率が向上するとともに、各補正板 23 a, 23 b, 23 c の誤挿入が発生せず、最適な多光子励起画像が容易に得られる。

【0044】

又、各補正板 23 a, 23 b, 23 c は、平行光束にコリメートされたパルスレーザ Q の光路上に挿入されるので、各補正板 23 a, 23 b, 23 c が各対物レンズ 14 a, 14 b, 14 c の性能を劣化させることなく、システム全体の光学性能を容易に維持できる。

【0045】

なお、本発明は、上記一実施の形態に限定されるものでなく次の通り変形してもよい。

例えば、各補正板 23 a, 23 b, 23 c の挿入位置は、平行光束のパルスレーザ Q の光路上であれば走査光学ユニット 7 の内部に限ることはなく、好ましくはレーザ光源 4 からダイクロイックミラー 16 までの間、例えばビームコリメータ 5 とプレチャープコンペンセータ 6 との間、若しくはプレチャープコンペンセータ 6 と走査光学ユニット 7 との間に配置してもよい。

【0046】

又、各補正板 23 a, 23 b, 23 c は、各対物レンズ 14 a, 14 b, 14 c の光学系が無限遠系であれば、レボルバ 13 に内蔵することで、機械的に連動する機構の代用とすることもできる。この場合、一对のガルバノミラー 17, 18 が走査されることにより、各補正板 23 a, 23 b, 23 c には常に垂直にレーザが入射するわけではなくなるので、各対物レンズ 14 a, 14 b, 14 c の光学性能を十分に発揮できなくなるものの、走査光学ユニット 7 の内部若しくは外部にレボルバ 13 の動きに連動して各補正板 23 a, 23 b, 23 c を切り換える補正板切換え装置 22 が不要となるので、装置構成がシンプルとなるとともに安価となり、かつ誤動作の心配もない。

【0047】

又、各補正板 23 a, 23 b, 23 c は、同じ板厚に形成し、硝材を変えることで屈折率を変化させ、光学的光路長を調整する方式を採用してもよい。この場合、各補正板 23 a, 23 b, 23 c は、外観寸法は全く同じになるので、補正板切換え装置 22 に取り付けするための部品を共通化できる。

又、補正板切換え装置 22 は、ターレット等の回転式である必要はなく、例えばキューブ等を用いたスライダ式にしてもよい。

【0048】

【発明の効果】

以上詳記したように本発明の請求項 1～3 によれば、対物レンズの切り換えによって標本面でのレーザパルス幅が変化しないレーザ顕微鏡を提供できる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明に係わる走査型レーザ顕微鏡の一実施の形態を示す構成図。

【符号の説明】

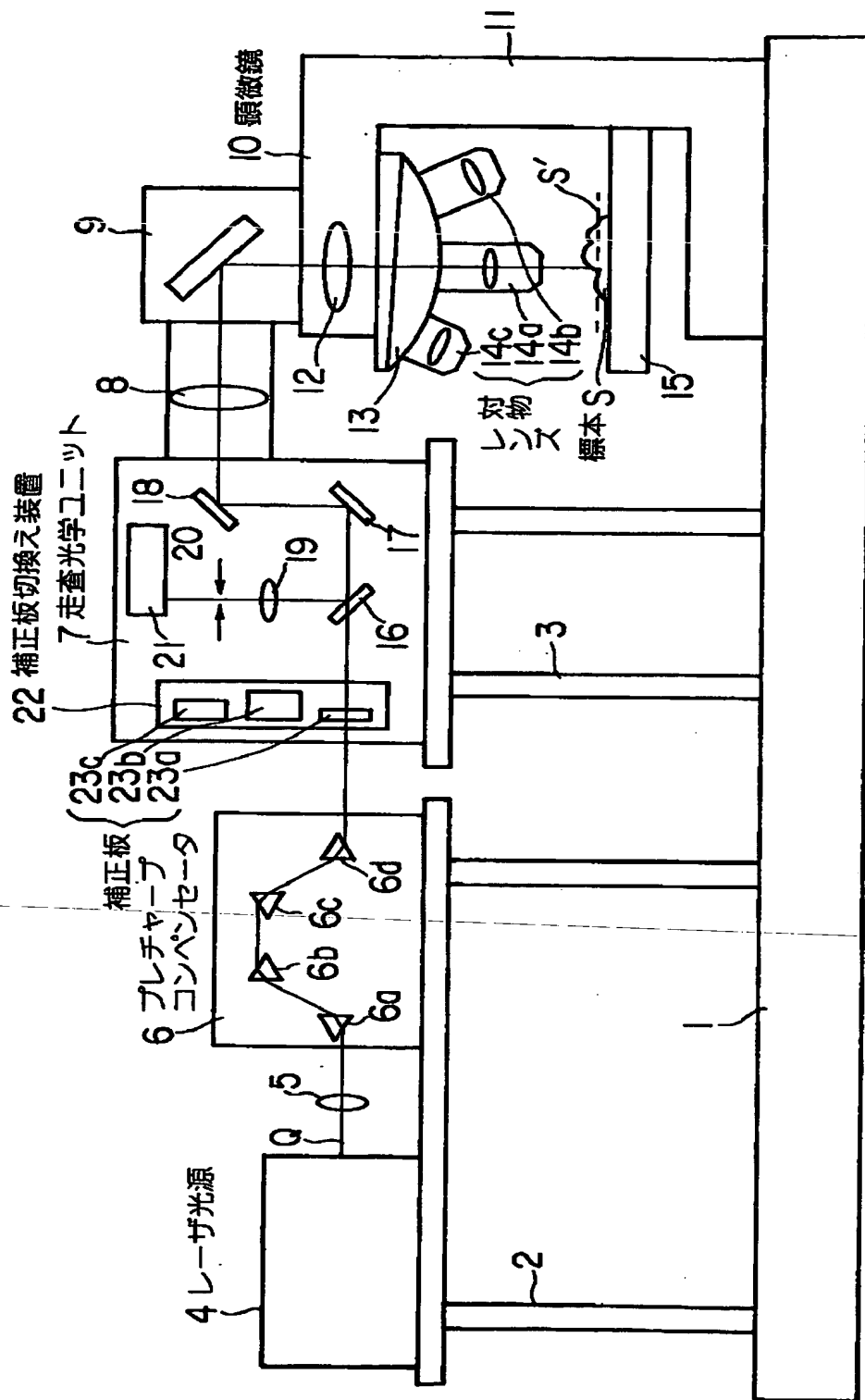
- 4 : レーザ光源、
- 5 : ビームコリメータ、
- 6 : プレチャープコンペンセータ、
- 7 : 走査光学ユニット、

- 10 : 顕微鏡、
- 12 : 結像レンズ、
- 13 : レボルバ、
- 14 a, 14 b, 14 c : 対物レンズ、
- 15 : ステージ、
- 16 : ダイクロイックミラー、
- 17, 18 : ガルバノミラー、
- 19 : 集光レンズ、
- 20 : ピンホール、
- 21 : フォトマルチプライヤ、
- 22 : 補正板切換え装置、
- 23 a, 23 b, 23 c : 補正板、
- S : 標本。

【書類名】

図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、対物レンズの切り換えによって標本面でのレーザーパルス幅を変化させない。

【解決手段】 パルスレーザーQを標本Sの面でレーザーパルス幅を最小にするためのプレチャープコンペンセータ6に通し、このプレチャープコンペンセータ6を通過したパルスレーザーQを複数の対物レンズ14a, 14b, 14cのうち所望の対物レンズにより標本Sに集光するレーザー顕微鏡に、複数の対物レンズ14a, 14b, 14cに対応してそれぞれ標本Sの面でのレーザーパルス幅を一定にする複数の補正板23a, 23b, 23cを備えた。

【選択図】 図1

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000000376
【住所又は居所】 東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目 4 3 番 2 号
【氏名又は名称】 オリンパス光学工業株式会社

【代理人】 申請人

【識別番号】 100058479
【住所又は居所】 東京都千代田区霞が関 3 丁目 7 番 2 号 鈴榮内外國
特許法律事務所内

【氏名又は名称】 鈴江 武彦

【選任した代理人】

【識別番号】 100084618
【住所又は居所】 東京都千代田区霞が関 3 丁目 7 番 2 号 鈴榮内外國
特許法律事務所内

【氏名又は名称】 村松 貞男

【選任した代理人】

【識別番号】 100068814
【住所又は居所】 東京都千代田区霞が関 3 丁目 7 番 2 号 鈴榮内外國
特許法律事務所内

【氏名又は名称】 坪井 淳

【選任した代理人】

【識別番号】 100100952
【住所又は居所】 東京都千代田区霞が関 3 丁目 7 番 2 号 鈴榮内外國
特許法律事務所内

【氏名又は名称】 風間 鉄也

【選任した代理人】

【識別番号】 100097559
【住所又は居所】 東京都千代田区霞が関 3 丁目 7 番 2 号 鈴榮内外國
特許法律事務所内

【氏名又は名称】 水野 浩司

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000000376]

1. 変更年月日 1990年 8月20日
[変更理由] 新規登録
住 所 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号
氏 名 オリンパス光学工業株式会社
